云　南　植　物　研　究　2006，28 (5)：543～552
Acta Botanica Yunnanica

碳酸酐酶Ⅱ及其抑制剂研究进展*

曾广智[1,2]，黄火强[1,2]，谭宁华[1**]，嵇长久[1]，潘蓄林[1,2]
(1 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室，云南 昆明　650204；
2 中国科学院研究生院，北京　100039)

摘要：碳酸酐酶Ⅱ是一种活性中心含有 Zn^{2+}、能催化 $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ 反应的金属酶。它广泛分布于人体多种组织、器官中，与人体酸碱平衡、青光眼、骨质疏松症、癌症等多种生理或病理过程密切相关，多年来一直备受关注。自从 1992 年高分辨率的碳酸酐酶Ⅱ晶体结构测定以来，其抑制剂研究发展较快，已有活性好、选择性强的抑制剂作为新药应用于临床。本文以碳酸酐酶Ⅱ结构、功能和抑制剂研究为重点，主要介绍近 15 年来该领域研究的一些重要进展。

关键词：碳酸酐酶Ⅱ；结构；功能；抑制剂
中图分类号：Q 946　　文献标识码：A　　文章编号：0253-2700(2006)05-543-10

Carbonic Anhydrase Ⅱ: Structures, Functions and Inhibitors*

ZENG Guang-Zhi[1,2], HUANG Huo-Qiang[1,2], TAN Ning-Hua[1**],
JI Chang-Jiu[1], PAN Xu-Lin[1,2]
(1 *State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China; 2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100039, China)

Abstract: Human carbonic anhydrase Ⅱ is one of the most efficient one in carbonic anhydrase isozymes, which catalyzes the reversible hydration/dehydration of CO_2 and water: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$. It is found in virtually every tissue and cell type, and involves in many human physiological and pathological processes, such as human acid-base balance, glaucoma, osteoporosis, and cancer. Since discovered in 1940, carbonic anhydrase Ⅱ has been an important drug target with more attention. Up to now, many inhibitors were discovered including some clinical therapeutic drugs. This paper reviewed recent developments in structures, functions and inhibitors of human carbonic anhydrase Ⅱ.

Key words: Carbonic Anhydrase Ⅱ; Structures; Functions; Inhibitors

碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrases, CAs) 是一类分布广泛的含锌金属酶，它能可逆性地催化 CO_2 的水合反应，产生参与人体多种生理功能的 HCO_3^- 及 H^+。自从 1933 年首次从牛红细胞中纯化得到第一个碳酸酐酶以来，到目前为止，除了真菌外，其他生物体中都已发现了该类酶的存在 (Smith 等，1999；Thoms，2002)。根据碳酸酐酶氨基酸序列的不同，人们主要将其分为 α、β、γ、δ、ε 五种不同类型的酶。其中 α-CAs 存在于脊椎动物、细菌、藻类及绿色植物的胞浆中；β-CAs 存在于高等植物及藻类叶绿体中，对植物光合作用过程中 CO_2 的获取及 CO_2 浓度的维持有着必不可少的作用；γ-CAs 则主要存在于太古细菌及一些细菌中；δ-CAs 主要存在于海洋硅藻

* 基金项目：西部之光项目 (KSCX1-09-03-1、KSCX-SW-11) 及国家自然科学基金项目 (30572258)
** 通讯联系人　Corresponding author. Tel Fax: 86-871-5223800. E-mail: nhtan@mail.kib.ac.cn
收稿日期：2005-12-05，2006-03-09 接受发表
作者简介：曾广智 (1976-) 女，硕博研究生，主要从事体外生物活性筛选模型的建立与应用、天然抑制剂的构效关系分析及作用机理研究。

中；ε-CAs 是近年来才确定的类型，主要存在于蓝细菌及一些化能自养型细菌中。多年来人们对碳酸酐酶的研究主要集中在与人类关系密切的α-CAs 和 β-CAs 上（Lehtonen 等，2004；Tripp 等，2001；2004）。α-CAs 在氨基酸序列上存在 20～60％的同源性，哺乳动物的几乎所有组织中都含有参与机体多种生命活动的α-CAs。目前的研究表明，α-CAs 至少存在 14 种不同的同工酶：CA Ⅰ—Ⅲ，CA Ⅶ 及 CA XIII 为胞浆酶；CA Ⅳ，CA Ⅸ，CA Ⅻ 和 CA XIV 为膜连接酶；CA Ⅴ 为线粒体酶；CA Ⅵ则存在于唾液中；另外还有 3 种已知的非催化形式的碳酸酐酶相关蛋白（CA Related Protein，CARP）——CARP Ⅷ，CARP Ⅹ 及 CARP Ⅺ（Lehtonen 等，2004；Supuran 等，2003；Wingo 等，2001）。人体中也含有多种碳酸酐酶的同工酶，它们广泛分布于多种组织器官中，其中催化 CO_2 水合效率最高、研究也最为透彻的是碳酸酐酶Ⅱ（CA Ⅱ）(Loferer 等，2003)。

CA Ⅱ是于 1940 年发现的第一个含锌金属酶 (McCall 等，2000)，它广泛存在于人体肾脏、脑、胰腺、胃粘膜、骨骼肌、视网膜及晶状体等组织器官中，它能高效催化 CO_2 的水合反应（$k_{cat}/K_M = 1.5 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$）(Kim 等，2002)，产生在人体多种生理活动中发挥重要作用的质子和 HCO_3^-，故而与人类关系密切，若该酶缺失、表达异常或活性发生改变都会引发机体的病变。纠正该酶异常表达或抑制该酶的过高活性也能对 CA Ⅱ引发的疾病起到积极的治疗作用，如治疗青光眼的 CA Ⅱ抑制剂多佐胺（dorzolamide）等。因此，了解 CA Ⅱ的结构特点及其生理和病理功能，对我们发现其抑制剂并用于疾病治疗具有重要的意义。

多年来碳酸酐酶Ⅱ一直是人们研究的对象，有关其研究的综述性论文也很多，这些论文大多关于该酶作用的某一方面。针对该靶标蛋白，我们实验室采用体外活性筛选方法发现了一些活性较好的 CA Ⅱ抑制剂，并应用计算机辅助药物设计的手段，对该酶及其抑制剂的相互作用作了进一步的研究。本文在此研究基础上，对 CA Ⅱ的结构、功能及近十几年来该酶抑制剂研究的主要进展作较详细的介绍。

1　CA Ⅱ的结构

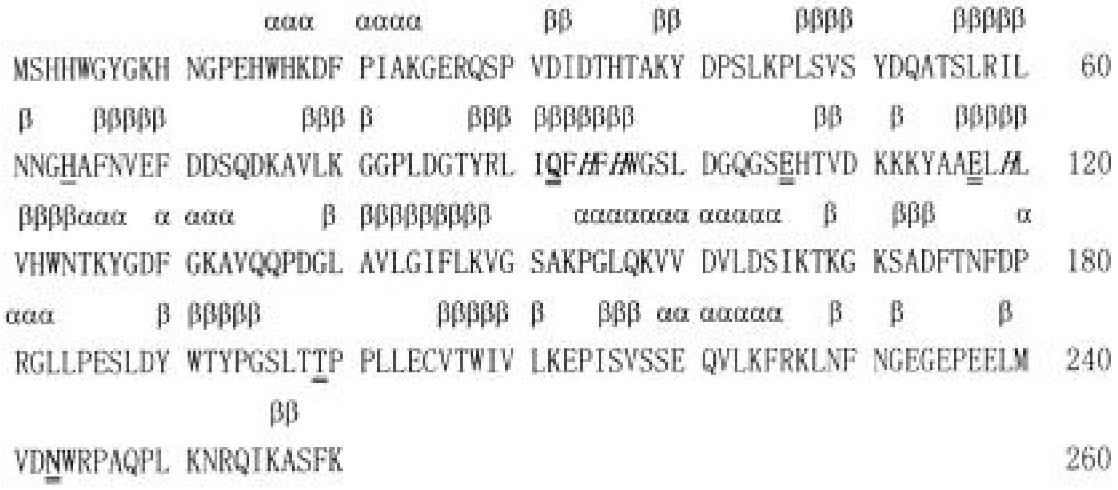
1.1　CA Ⅱ的结构特点

碳酸酐酶Ⅱ（EC 4.2.1.1）为含有 260 个氨基酸残基、分子量为 29246Da、活性中心含有催化所必需的 Zn^{2+} 的金属酶（Scolnick 等，1997）。Liljas 等于 1972 年首次得到了人类碳酸酐酶Ⅱ（hCA Ⅱ）的 X 晶体结构衍射图，Eriksson 及 Hakansson 等又分别于 1988 年、1992 年对其结构进行修正，得到了更高分辨率（2Å 及 1.54Å）的 hCA Ⅱ的 X 晶体结构图 (McCall 等，2000)。

在 CA Ⅱ的空间结构中，只有位于酶分子 N 末端、约由 24 个氨基酸残基组成的区域与酶呈松散连接，除此之外，整个 CA Ⅱ分子近似于球形，体积大小约 5 nm×4 nm×4 nm。其主要二级结构为位于酶分子中的 10 条 β-链，由于它们的存在，使得该酶被分为两个部分，酶分子中与其活性相关的许多关键氨基酸残基位点都位于该结构中。除 β-链结构外，酶分子表面还分布有一些相对较短的 α-螺旋结构（Lindskog，1997；Hunt 等，1999）(图 1)。

1.2　CA Ⅱ结构与其催化作用的关系

CA Ⅱ的主要功能是可逆性催化 CO_2 和 HCO_3^- 的相互转化（$CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$），其催化作用主要是通过酶活性区域内的一系列重要氨基酸残基及与这些残基配位连接的 Zn^{2+} 来实现的。CA Ⅱ晶体结构显示，酶的活性区域位于由 β-链构成的≈15Å 大小的一个空腔结构中，催化所必需的 Zn^{2+} 位于该区域底部，并与 β-链上的氨基酸残基 His94，His96，His119 的季铵氮原子配位结合，另外再与第四配基 H_2O 或 OH^- (取决于溶液 pH：pH < 7 时与 H_2O；生理条件下 pH > 7，与 OH^-）相连而形成四面体结构（Loferer 等，2003；Hunt 等，1999；Jonsson 等，1993）。这些与 Zn^{2+} 相连的直接配体，能够通过其分子中的氢键供体 (咪唑基仲胺 N 上的 H) 与酶分子中具有氢键受体的残基相连：如 His94 与 Gln92、His96 与 Asn244、His119 与 Glu117、连接 Zn^{2+} 的 H_2O/OH^- 与 Thr199 形成氢键后，Thr199 再与 Glu106 形成氢键连接。相对于与 Zn^{2+} 相连的直接配体，这些氢键受体被称为“非直接配体”(indirect ligands) (McCall 等，2000)。另外在 Zn^{2+} 连接部位的相邻处，还存在一个由 Val121，Leu141，



a. 碳酸酐酶 II 的氨基酸序列

a. Amino acid sequence of hCA II

b. 碳酸酐酶 II 结构图 (PDB ID: 1a42)

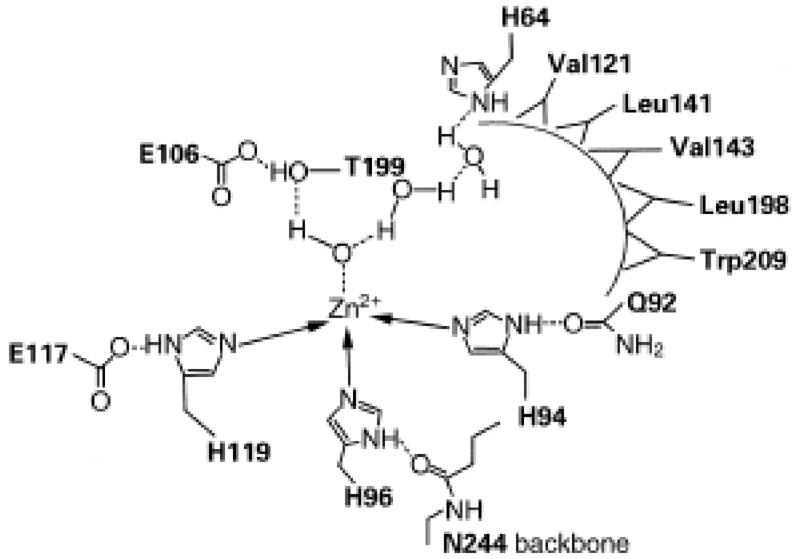
b. Structure of hCA II

图 1　碳酸酐酶 II 的一级结构及高级结构图

Fig. 1　Structures of human carbonic anhydrase II

数据来源: Swiss-Protein (http://www.expasy.org/sprot/) 及 EMBL-EBI (http://www.ebi.ac.uk/embl/)

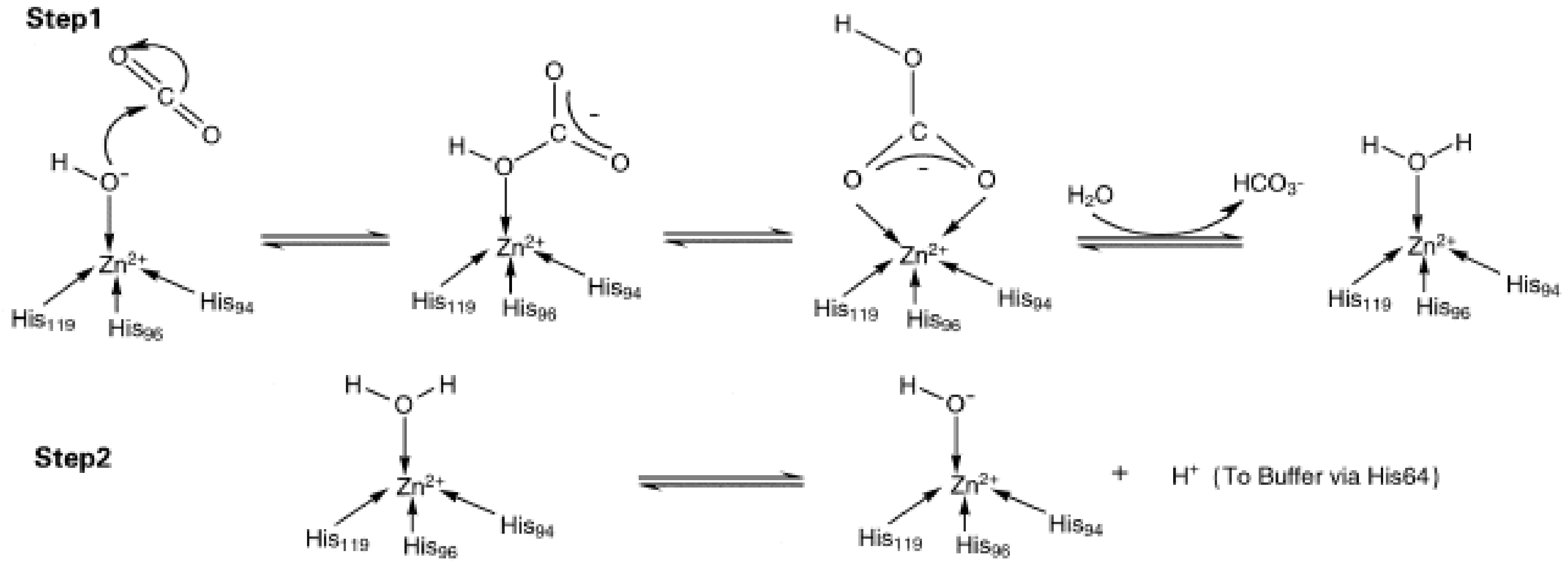
序列中重要氨基酸残基： *H* **为与** Zn^{2+} **连接的配基** His94，96，119；H **为参与质子转运的残基** His64；Q、E、E、T、N **为非直接配体**



a. CA II 活性部位的氢键网状系统

a. Active site structure of hCA II

Val143，Leu198 及 Trp209 组成的一个大的疏水袋，该疏水袋能结合底物 CO_2，是催化底物的预催化结合位点（Christianson，1996）。在原酶分子（native enzyme）中，疏水袋口还含有一个被称作“深水”(deep water) 的水分子（Scolnick 等，1997）。直接配体与非直接配体的相互作用，形成了一个强大的氢键网状系统，该系统及疏水袋的存在能够增加酶分子中 Zn^{2+} 连接的稳定性，很好地固定底物 CO_2 所在的位置，加强与 Zn^{2+} 相连的 H_2O HO^- 对 CO_2 的亲核能力，进而使其高效地发挥酶的催化作用（图 2a）(Supuran 等，2003；Lindskog，1997)。



b. CA II 催化 CO_2 水合反应的机制

b. CO_2 hydration mechanism of hCA II

图 2　碳酸酐酶 II 结构与水合机制

Fig. 2　Structure and CO_2 hydration mechanism of hCA II

CA Ⅱ对 CO_2 的催化过程主要可以分为两个步骤：(1) 生理条件下，与 Zn^{2+} 相连的 H_2O 去质子化形成 $EZnOH^-$，由于氢键系统等结构的存在，使得与 Zn^{2+} 相连的 OH^- ($EZnOH^-$) 中的氧具有很强的亲核性，它能亲核进攻结合于疏水袋中的底物 CO_2，首先形成 $EZnHCO_3^-$，$EZnHCO_3^-$ 中的 HCO_3^- 被溶剂水分子取代，形成 $EZnH_2O$ 和 HCO_3^-；(2) $EZnH_2O$ 通过酶分子中的质子转运体将质子 (H^+) 转运至溶剂中，并还原产生有催化活性的 $EZnOH^-$ (Thoms，2002；Christianson，1996；An 等，2002；Elder 等，2004；Nakata 等，2002)。在催化过程中 H^+ 向溶剂中的转运主要是通过位于酶分子活性区域，距离 Zn^{2+} 约 7 的 His-64 来实现的，并且分子内质子向溶剂中转移的步骤也是 CA Ⅱ催化反应中的限速步骤 (图 2b) (Elder 等，2004；Duda 等，2001)。

2 CA Ⅱ的功能

虽然碳酸酐酶 II 催化的只是一个简单的生理反应，但是其催化的底物 CO_2 及产物 HCO_3^-、H^+ 却与人体多种生理及病理活动关系密切，如呼吸过程中代谢组织与肺之间 CO_2/HCO_3^- 的转运，pH 与 CO_2 浓度之间的平衡，组织器官中电解质的分泌，青光眼、骨质疏松症、癫痫、肿瘤等疾病的形成 (Casini 等，2003b) 等。正常生理条件下，CA Ⅱ通过催化产生人体各种代谢活动所必需的 H^+ 或 HCO_3^-，完成机体的正常生命活动。一旦该酶缺失或其活性发生异常都将导致机体的病变，这使得 CA Ⅱ成为多种人类疾病研究中的重要靶点。

碳酸酐酶Ⅱ缺陷是一种罕见的常染色体隐性遗传性疾病，其发病的分子基础是由于位于常染色体 8q22 位置处编码该酶的基因发生突变所致。目前已经明确了多种由于该酶结构基因突变所引发的 CA Ⅱ缺陷疾病，其临床表现为：骨硬化症、肾小管酸中毒、脑钙化、发育迟缓、肾钙沉着症、泌尿道结石病等病变中的一种或多种同时出现 (Nagai 等，1997；Roth 等，1992；Ismail 等，1997)。

碳酸酐酶Ⅱ是所有碳酸酐酶中催化效率最高的酶之一。在没有酶催化的条件下，CO_2 也能水合产生 HCO_3^- 及 H^+，但是其反应速率仅为 $5\times10^{-2}s^{-1}$，当 CA Ⅱ存在时其水合反应速率可以增加到 $1.6\times10^6 s^{-1}$ (Kim 等，2002；Sun and Alkon，2002)，极大地提高了反应速度，从而能够满足机体代谢的需求。CA Ⅱ广泛分布于人体内，在红细胞、肺泡、破骨细胞、肾小管、脑、胰腺、胃粘膜、食管、骨骼肌、视网膜及睫状体等几乎所有组织及细胞类型中都发现有 CA Ⅱ存在 (Kim 等，2002；Christie and Thomson，2000；Rousselle and Heymann，2002；Henry，1996)。

2.1 呼吸、代谢及酸碱平衡

CA Ⅱ在人体内分布广泛，其催化底物 CO_2 为有氧呼吸的代谢终产物。整个催化反应中既含有气体又含有离子，且其作用与离子交换子 (Na^+/H^+ 交换子、Cl^-/HCO_3^- 交换子) 紧密相关，故它在呼吸及多种生化反应的中间代谢过程中都具有很重要的作用 (Henry，1996；Li 等，2002；Vince 等，2000)。

在人体代谢过程中，代谢终产物 CO_2 能够从组织细胞中扩散进入血液红细胞，进而被红细胞中的 CA Ⅱ催化产生 HCO_3^-，再通过胞浆膜上的 Cl^-/HCO_3^- 交换子将其转运入血，通过血液循环到达肺部。在肺部 HCO_3^- 通过红细胞膜上的 Cl^-/HCO_3^- 交换子转运入红细胞，经 CA Ⅱ催化产生 CO_2，CO_2 通过扩散作用穿透红细胞膜及肺泡细胞膜后，通过呼吸作用排出体外。整个呼吸过程中，CA Ⅱ对增加血液携 CO_2 量 (提高血液 CO_2 分压) 以进行正常的气体交换起到了重要作用 (Sterling 等，2001)。除此之外，细胞中的 CAs 包括 CA Ⅱ通过维持 CO_2 与 HCO_3^- 之间的瞬时化学平衡，可以将一些代谢反应的终产物 CO_2 转运用于一些合成代谢途径中，如糖异生、脂肪酸生成、氨基酸合成及尿素生成等。所以 CAs 在 CO_2 转运及代谢过程中起到了分子连接的作用 (Henry，1996)。

在肾脏的排酸保碱过程中，存在于肾小管上皮细胞中的 CA Ⅱ也发挥了重要作用。因为 HCO_3^- 在血浆中以 $NaHCO_3$ 存在，肾小球滤过液中的 $NaHCO_3$ 进入肾小管后可以解离成 Na^+ 和 HCO_3^-，其中 Na^+ 可以通过 Na^+ - H^+ 交换进入到细胞内，H^+ 则由细胞分泌至小管液中。小管

液中的 H^+ 可与 HCO_3^- 结合生成 H_2CO_3，在 CA Ⅱ的作用下快速分解为 CO_2 和 H_2O，高度脂溶性的 CO_2 能迅速通过管腔膜进入细胞内，再在 CA Ⅱ的作用下与 H_2O 结合生成 H^+ 和 HCO_3^-，HCO_3^- 与 Na^+ 一起转运入血，H^+ 则通过 Na^+-H^+ 交换从细胞分泌至小管液中重复此循环（张镜如和乔健天，1997）。

2.2　青光眼

房水具有营养角膜和晶状体，并维持眼内压的功能。它主要是由睫状体上皮细胞分泌及血管渗出而产生，经瞳孔流入前房到达前房角间隙，再经小梁网流入巩膜静脉窦，最后进入血流（江明性和杨藻宸，1998）。眼内压增高是眼内房水流入与流出之间平衡失调的表现，也是青光眼的主要特征。青光眼尤其是原发性青光眼是容易导致人类不可逆性失明的主要因素。多种随机试验表明，在眼压增高尤其是开角型青光眼的情况下，降低眼内压是阻止疾病恶化致盲的唯一有效方法，这也是目前青光眼治疗的主要手段。其中降低眼内压的一条主要策略就是减少房水的流入（Kaur 等，2002；Khaw 等，2004；Civan and Macknight，2004）。抑制眼内睫状体上皮细胞内的 CA Ⅱ的活性，即能有效达到这一目的。

眼睫状体上皮细胞内存在 CA Ⅱ，它是眼组织中负责房水分泌的主要酶（Abbate 等，2004a）。CA Ⅱ催化 CO_2 水合产生的 HCO_3^- 经细胞分泌、血管渗出于房水中，为了保持房水中液体的电中性，Na^+ 向房水中分泌增加，同时带动 Cl^- 也向房水中转移，从而使房水中形成高渗透压，于是促进 H_2O 向房水流动，维持房水平衡和正常的 pH 值。抑制 CA Ⅱ的活性，HCO_3^- 的生成减少，进而减少房水的生成。CA Ⅱ抑制剂能有效降低眼内压，目前市场上的该类药物也大都用于青光眼的治疗，如口服的乙酰唑胺（acetazolamide）、局部用药的多佐胺及布林唑胺（brinzolamide）等。相对于胆碱能激动剂、β-受体阻断剂及前列腺素类似物等青光眼治疗药，CA Ⅱ抑制剂具有其独特的优势，在别的抗青光眼药物无效或急性青光眼发作时其效果明显（Kaur 等，2002；Khaw 等，2004；Civan and Macknight，2004）。

2.3　骨质疏松症

成骨细胞和破骨细胞是维持骨重建与骨吸收平衡的关键因素，当由于生理或病理的因素使得该平衡被打破，骨吸收大于骨重建时即会发生骨质疏松症。破骨细胞中含有碳酸酐酶Ⅱ，在生理或病理状况下，它在破骨细胞骨吸收过程中都发挥了重要的作用。

骨吸收过程中，破骨细胞首先附着于骨骼表面形成相对隔绝的细胞外的骨吸收微环境，然后在酸性条件下（～pH4.5）先溶解骨矿物质，继而降解骨基质成分（刘继中和胡蕴玉，2002；Rousselle and Heymann，2002；Lehenkari 等，1998）。在此过程中，骨吸收所必需的酸性微环境，就是通过破骨细胞中所含有的 CA Ⅱ形成的：CA Ⅱ催化 CO_2 与 H_2O 反应生成 H^+，并通过破骨细胞皱褶缘上的 H^+-ATPase 将 H^+ 转运至吸收微环境中进而形成酸性吸收微环境，再通过 Cl^-/HCO_3^- 交换，转运入 Cl^- 以维持电荷平衡。另外，由于 CA Ⅱ的表达随着破骨细胞功能状态的不同而发生变化，在骨吸收状态下它呈高表达，所以抑制该酶活性可以降低破骨细胞的骨吸收作用（赵海波和朱通伯，1997；Rousselle and Heymann，2002），病理状态下抑制其活性也可以达到防治骨质疏松症的目的。

2.4　癫痫

癫痫是一种严重的、突发性的脑部神经元同步兴奋继而产生以癫痫发作为特征的神经错乱疾病。许多抗惊厥药物如苯妥英、苯巴比妥及苯二氮卓类药物等都对癫痫发作有效。它们或通过阻断电压依赖性 Na^+ 通道（减少 Na^+ 内流）、或通过增加 GABA 受体偶联的 Cl^- 通道的开放的频率（促进 Cl^- 内流）等作用来降低神经元兴奋性，从而达到抑制癫痫发作的目的（Ilies 等，2004；江明性和杨藻宸，1998）。除此之外人们还发现 CAs 与癫痫发作之间存在联系，因为细胞内外的 pH 改变对调节神经元兴奋性有很重要的作用，其间的微小变化就可以改变配体门控性通道及电压门控性通道的功能。CAs 由于能催化 CO_2 水合产生 HCO_3^- 及 H^+，对调解细胞外 pH 变化起到了很大的作用。CA Ⅱ的经典抑制剂乙酰唑胺，醋甲唑胺（methazolamide），碳酸酐酶的强抑制剂托吡酯（topiramate）等都有抗惊厥作用，也可以治疗癫痫发作。但是它们对该酶的抑制作用在多大程度上

与其抗癫痫活性有关，以及别的抗癫痫药物是否影响 pH 的调节作用目前还不太清楚（Supuran 等，2003；Aribi and Stringer，2002），所以有关该酶与癫痫病的相互关系还有待于深入研究。

2.5 癌症

近年来，随着碳酸酐酶同工酶的不断发现，人们发现 CAs 与癌症之间可能也存在联系，尤其是碳酸酐酶Ⅸ。CA Ⅸ主要存在于癌细胞中，而在正常细胞中却没有发现其存在（Casey 等，2004；Pastorekova 等，2004），于是寻找它的抑制剂或探寻其抑制剂与癌症治疗之间的关系也成为有关碳酸酐酶研究的热点。虽然有关碳酸酐酶与癌症关系的报道主要集中在 CA Ⅸ，但也有文章报道 CA Ⅱ可能也与癌症有关。实体瘤胞外的 pH 值要远低于其邻近的正常组织，而其胞内 pH 则与正常组织 pH 相同或稍偏碱性，肿瘤细胞可以表达 CAs 和一些离子交换蛋白，故而导致肿瘤细胞异常 pH 状况的形成。目前在恶性脑瘤、胃癌、胰腺癌及恶性血液癌症等肿瘤细胞中都发现 CA Ⅱ的存在，但由于其在肿瘤细胞中表达的情况还不清楚，且它在正常组织细胞中也有表达，所以它与肿瘤发生之间的关系还有待于进一步研究（Leppilampi 等，2002；Supuran 等，2003）。

3 CA Ⅱ的抑制剂

碳酸酐酶Ⅱ是参与机体多种代谢活动的一种重要酶，研究其抑制剂有助于多种重大疾病的诊断及治疗。到目前为止已经发现了许多 CA Ⅱ的抑制剂，其中磺酰胺类是该酶抑制剂中的一个大家族，已经有一些该类型的抑制剂用于或即将用于临床疾病的治疗。随着人们对该酶不断深入研究，许多新的有应用前景的抑制剂也不断被报道。

3.1 磺酰胺类及其衍生物

60 多年前就已经发现磺酰胺类化合物对 CAs 有抑制作用，其结构中的（R）SO_2NH_2 基团是发挥作用的主要官能团。大量磺酰胺类抑制剂与碳酸酐酶复合物的晶体结构表明，磺酰胺类对 CAs 的抑制作用类似于阴离子 HSO_3^-：未取代的磺酰胺基团以阴离子的形式（R-SO_2NH^- 或 R-SO_2N-OH^-）通过其基团中的 N 与酶活性中心的 Zn^{2+} 相连接，取代与 Zn^{2+} 相连的水分子与 Thr-199 的 OH-形成氢键。基团中的一个氧原子与 Thr-199 的 NH 形成氢键，另一个氧原子朝向 Zn^{2+} 位置（Lindskog，1997；Casini 等，2003b；Arslan 等，1997）（图 3）。

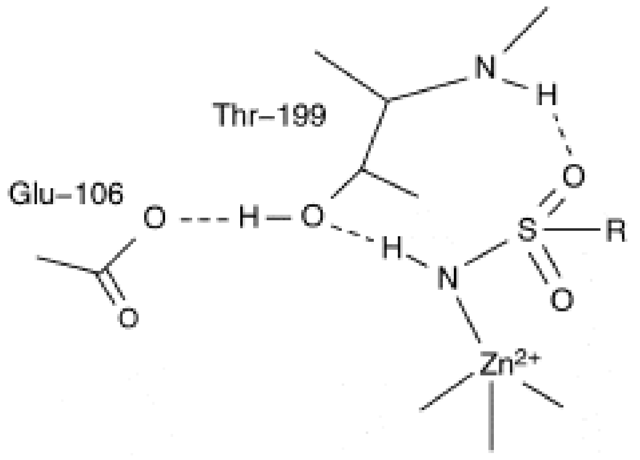


图 3 磺酰胺类化合物与 CA Ⅱ活性位点的结合

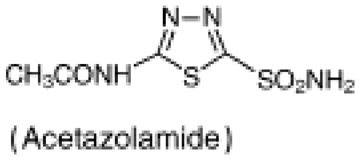
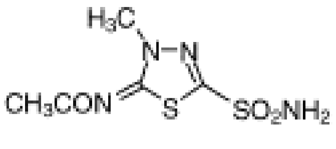
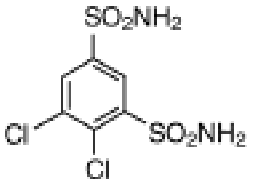
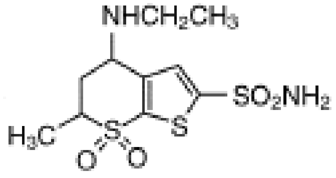
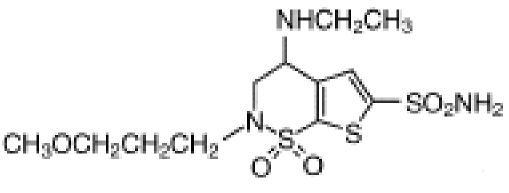
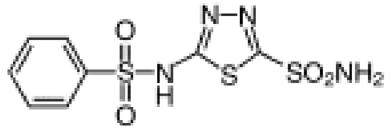
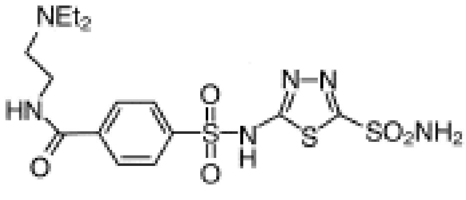
Fig. 3 Sulfonamides and its derivatives bound to the active site of hCA Ⅱ

-SO_2NH_2 是磺酰胺类碳酸酐酶抑制剂的主要官能团，只有含有未取代的-SO_2NH_2 或-SO_2NH(OH) 基团的磺酰胺类化合物才是该酶的有效抑制剂。改变与其相连的 R 基团的结构可以得到一系列活性不同的该类型抑制剂（Lindskog，1997）。研究发现，RSO_2NH_2 中 R 基团为芳环或杂环时其对 CA Ⅱ的抑制作用较强，如乙酰唑胺 (**1**)、醋甲唑胺 (**2**)、双氯非那胺（dichlorophenamide，**3**）等，它们用于青光眼临床治疗已经有 40 多年的历史。作为用于青光眼治疗的第一代碳酸酐酶抑制剂，它们多为口服制剂，对眼组织外的 CAs 有抑制作用，副作用较多（Kaur 等，2002；Arslan 等，1997；Casini 等，2003a）。针对 R 基团改造，人们合成得到了许多活性好、选择性强的新芳环/杂环磺酰胺类抑制剂，它们除了可以用于青光眼治疗外，还可用于其它与 CA Ⅱ代谢相关的疾病。如对 CA Ⅱ选择性较强的多佐胺 (**4**) 及布林唑胺 (**5**) 等，它们是最先得到美国 FDA 认可，局部给药用于治疗开角型青光眼的药物，属于青光眼治疗中的第二代碳酸酐酶抑制剂（Casini 等，2003b；Kaur 等，2002）。第二代抑制剂通过局部给药，减少了全身不良反应；但其对眼有刺激性，且作用时间短，所以人们又开展了第三代无刺激性长效碳酸酐酶抑制剂的研究。苯唑拉胺（benzolamide，**6**）为对青光眼有效的碳酸酐酶的强效抑制剂，Abbate 等（2004a）以其为先导分子，合成了一系列活性强、膜穿透

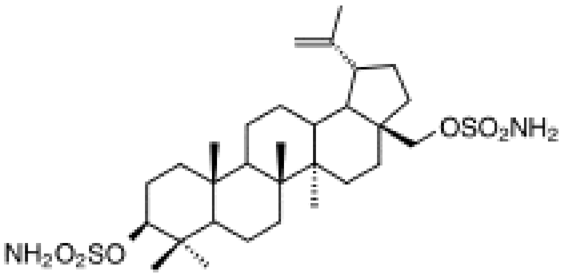
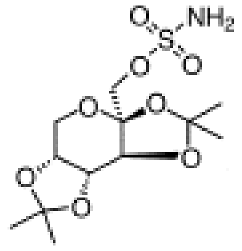
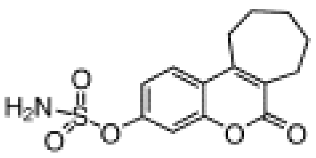
性高的化合物，其中一个化合物 (**7**) 对 CA II 的抑制活性强，且在动物体内试验中也显示出有效的降低眼内压的活性，具有很好的开发前景。带 1，3，4-噻二唑环的杂环磺酰胺类物质对 CAs 有较好的抑制活性，如其经典抑制剂乙酰唑胺、醋甲唑胺等（Bulbul 等，2002）。它们除了用于治疗青光眼外，近年来也用于癫痫病的治疗。有人认为它们通过抑制 CAs 能产生抗惊厥作用，至少对某些类型的癫痫发作有效（Ilies 等，2004）。除此之外，氨基磺酸盐及其衍生物也具有很强的 CA II 抑制作用，如化合物 **8** (Winum 等，2005)、抗癫痫药物托吡酯 (**9**)（Abbate 等，2004b）及 Vicker 等（2003）合成得到并已进入 I 期临床试验的抗癌药 667-COUMATE (**10**)。

表 1　合成的 CA II 抑制剂

Table 1　Synthetic inhibitors of hCA II

编号 No.	结构 Structure	活性 Activity	参考文献 Reference
1	 (Acetazolamide)	K_i = 12 nM	[a]Casini 等，2003
2	 (Methazolamide)	K_i = 14 nM	[a]Casini 等，2003
3	 (Dichlorophenamide)	K_i = 38 nM	[a]Casini 等，2003
4	 (Dorzolamide)	K_i = 9 nM	[b]Casini 等，2003
5	 (Brinzolamide)	K_i = 3 nM	[b]Casini 等，2003
6	 (Benzolamide)		[a]Abbate 等，2004
7		K_i = 1.4 nM	[a]Abbate 等，2004

续表1

编号 No.	结构 Structure	活性 Activity	参考文献 Reference
8	 (betulinyl-bis-sulfamate)	$K_i = 14.7$ nM	Winum 等，2005
9	 (Topiramate)	$IC_{50} = 5$ nM	[b]Abbate 等，2004
10	 (667-COUMATE)	$IC_{50} = 17$ nM	Vicker 等，2003

3.2　阴离子抑制剂

该类抑制剂主要是弱活性的单价阴离子，如 CN^-、HS^-、NCO^- 等。它们能与酶活性中心的 Zn^{2+} 结合，阻止酶催化活性中心发挥重要作用的 Zn^{2+} 与 OH^- 配位结构的形成，从而抑制酶的活性。在由 Zn^{2+} 连接的 H_2O、Thr199 和 Glu106 组成的氢键系统中，Zn^{2+}-H_2O/HO^- 除了与 Thr199 的羟基形成氢键以外，还与位于其旁边疏水袋中的另一个 H_2O 分子（deep water）形成氢键，该水分子再与 Thr199 的 NH 形成氢键连接，从而构成对抑制剂的结合有重要影响的氢键相互作用系统（图4a）。根据抑制剂结合与该氢键系统的关系，CA Ⅱ的阴离子抑制剂主要可以分为以下三种类型：(1) 质子化的配体原子（protonated ligand atom）取代与 Zn^{2+} 连接的溶剂水分子参与氢键的形成，而不改变与 Zn^{2+} 连接的四面体结构，如 HSO_3^- 及 HS^-（图4b）。(2) 由于缺少质子化的配体原子，本类型抑制剂取代 deep water 直接与金属离子相连，然后再与 Thr199 的 NH 形成氢键连接，如 SCN^-、$HCOO^-$、NCO^- 等（图4c）。(3) 本类抑制剂取代与金属相连的水分子直接与 Zn^{2+} 相连，但并不与 Thr199 的羟基形成氢键，因而使得 Zn^{2+} 四面体结构严重变形，卤素离子如 Br^-、I^-，另外还有叠氮离子等都属于这一类型（图4d）(Lindskog，1997；Gruneberg 等，2002)。

3.3　其它抑制剂

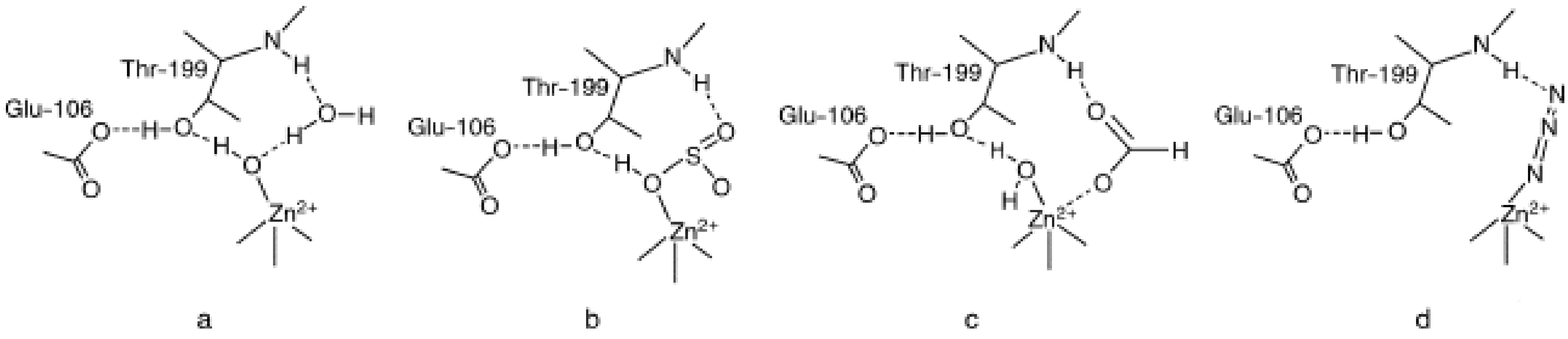


图4　阴离子类抑制剂与CA活性位点的结合

Fig. 4　Anion inhibitors bound to the active site of hCA Ⅱ

到目前为止，人们所发现的碳酸酐酶抑制剂类型较少，除了磺酰胺及其衍生物、阴离子抑制剂、苯酚以及在人以外的一些哺乳动物及鱼类中发现的一种分子量为 79 kDa 的糖蛋白外（Lindskog，1997），其它类型的该酶抑制剂鲜有报道。为了发现新型的 CA II 抑制剂，我们实验室对大量动植物来源的化合物、提取物或分离部位样品进行了随机筛选，发现了一些活性较好的样品(付祥等，2003)，为我们进一步发现新型的 CA II 抑制剂打下了基础。

4　展望

碳酸酐酶II与人体多种生理及病理活动相关，研究该酶的结构与功能，寻找其抑制剂用于疾病治疗也越来越引起人们的关注。由于 CA II在人体内分布广、同工酶种类多、同工酶之间相似性高，一般的抑制剂容易对其同工酶及其它组织中的 CA II也产生作用，因此临床应用副作用较多（Arslan 等，1997），这限制了碳酸酐酶II抑制剂作为新药的研发。因此，根据 CA II 的作用特点，今后有关该酶抑制剂的研究应该主要集中在寻找选择性强、组织特异性高的 CA II 抑制剂上。

〔参　考　文　献〕

刘继中，胡蕴玉，2002．破骨细胞骨吸收机制的研究进展［J］．中国矫形外科杂志，**9** (4)：401—402

江明性，杨藻宸，1998．药理学［M］．第四版．北京：人民卫生出版社，95—95

张镜如，乔健天，1997．生理学［M］．第四版．北京：人民卫生出版社，249—249

赵海波，朱通伯，1997．骨吸收分子酶学机制进展［J］．国外医学·创伤与外科基本问题分册，**18** (3)：152—154

Abbate F，Casini A，Scozzafava A，*et al*，2004a．Carbonic anhydrase inhibitors：X-ray crystallographic structure of the adduct of human isozyme II with a topically acting antiglaucoma sulfonamide［J］．*Bioorg Med Chem Lett*，**14**：2357—2361

Abbate F，Coetzee A，Casini A，*et al*，2004b．Carbonic anhydrase inhibitors：X-ray crystallographic structure of the adduct of human isozyme II with the antipsychotic drug sulpiride［J］．*Bioorg Med Chem Lett*，**14**：337—341

An H，Tu C，Duda D，*et al*，2002．Chemical rescue in catalysis by human carbonic anhydrases II and III［J］．*Biochemistry*，**41** (9)：3235—3242

Aribi AM，Stringer JL，2002．Effects of antiepileptic drugs on extracellular pH regulation in the hippocampal CA1 region in vivo［J］．*Epilepsy Res*，**49**：143—151

Arslan O，Kufrevioglu OI，Nalbantoglu B，1997．Synthesis and investigation of inhibition effects of new carbonic anhydrase inhibitors［J］．*Bioorg Med Chem*，**5** (3)：515—518

Bulbul M，Saracoglu N，Kufrevioglu OI，*et al*，2002．Bile acid derivatives of 5-amino-1，3，4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors：Synthesis and investigation of inhibition effects［J］．*Bioorg Med Chem*，**10**：2561—2567

Casey JR，Morgan PE，Vullo D，*et al*，2004．Carbonic anhydrase inhibitors．Design of selective，membrane-impermeant inhibitors targeting the human tumor-associated isozyme IX［J］．*J Med Chem*，**47** (9)：2337—2347

Casini A，Antel J，Abbate F，*et al*，2003a．Carbonic anhydrase inhibitors：SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates sulfamides with isozymes I，II and IV［J］．*Bioorg Med Chem Lett*，**13**：841—845

Casini A，Winum JY，Montero JL，*et al*，2003b．Carbonic anhydrase inhibitors：Inhibition of cytosolic isozymes I and II with sulfamide derivatives［J］．*Bioorg Med Chem Lett*，**13**：837—840

Christianson DW，1996．Structural aspects of divergent proton translocation trajectories in carbonic anhydrases II and V［J］．*Rigaku J*，**13** (1)：8—15

Christie KN，Thomson C，2000．The distribution of carbonic anhydrase II in human，pig and rat oesophageal epithelium［J］．*Histochem J*，**32** (12)：753—757

Civan MM，Macknight ADC，2004．The ins and outs of aqueous humour secretion［J］．*Exp Eye Res*，**78**：625—631

Duda D，Tu C，Qian M，*et al*，2001．Structural and kinetic analysis of the chemical rescue of the proton transfer function of carbonic anhydrase II［J］．*Biochemistry*，**40** (6)：1741—1748

Elder I，Han S，Tu C，*et al*，2004．Activation of carbonic anhydrase II by active-site incorporation of histidine analogs［J］．*Arc Bioch Biophys*，**421**：283—289

Fu X (付祥)，Tan NH (谭宁华)，Jiang LH (姜立花)，*et al*，2003．Searching for antiosteoporotic activities of extracts and fractions derived from natural sources targeting carbonic anhydrase II［J］．*Acta Bot Yumnan* (云南植物研究)，**25** (6)：724—729

Gruneberg S，Stubbs MT，Klebe G，2002．Successful virtual screening for novel inhibitors of human carbonic anhydrase：Strategy and experimental confirmation［J］．*J Med Chem*，**45** (17)：3588—3602

Henry RP，1996．Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism［J］．*Annu Rev Physiol*，**58**：523—538

Hunt JA，Ahmed M，Fierke CA，1999．Metal binding specificity in carbonic anhydrase is influenced by conserved hydrophobic core residues［J］．*Biochemistry*，**38** (28)：9054—9062

Ilies MA，Masereel B，Rolin S，*et al*，2004．Carbonic anhydrase inhibitors：Aromatic and heterocyclic sulfonamides incorporating adamantyl moieties with strong anticonvulsant activity［J］．*Bioorg Med*

Chem, **12**: 2717—2726

Ismail EAR, Saad SA, Sabry MA, 1997. Nephrocalcinosis and urolithiasis in carbonic anhydrase Ⅱ deficiency Sydrome [J]. *Eur J Pediatr*, **156**: 957—962

Jonsson BM, Hakansson K, Liljas A, 1993. The structure of human carbonic anhydrase Ⅱ in complex with bromide and azide [J]. *FEBS*, **322** (2): 186—190

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, *et al*, 2002. Acetazolamide: Future perspective in topical glaucoma therapeutics [J]. *Int J Pharm*, **248**: 1—14

Khaw PT, Shah P, Elkington AR, 2004. ABC of eyes, Glaucoma-2: Treatment [J]. *BMJ*, **328**: 156—158

Kim CY, Whittington DA, Chang JS, *et al*, 2002. Structural aspects of isozyme selectivity in the binding of inhibitors to carbonic anhydrases Ⅱ and Ⅳ [J]. *J Med Chem*, **45** (4): 888—893

Lehenkari P, Hentunen TA, Laitala-Leinonen T, *et al*, 1998. Carbonic anhydrase Ⅱ plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca^{2+} [J]. *Exp Cell Res*, **242**: 128—137

Lehtonen JM, Parkkila S, Vullo D, *et al*, 2004. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozyme XIII with aromatic and heterocyclic sulfonamides: A novel target for the drug design [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, **14**: 3757—3762

Leppilampi M, Koistinen P, Savolainen ER, *et al*, 2002. The expression of carbonic anhydrase Ⅱ in hematological malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, **8**: 2240—2245

Li X, Alvarez B, Casey JR, *et al*, 2002. Carbonic anhydrase Ⅱ binds to and enhances activity of the Na^+ H^+ exchanger [J]. *J Biol Chem*, **277** (39): 36085—36091

Lindskog S, 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase [J]. *Pharmacol Ther*, **74** (1): 1—20

Loferer MJ, Tautermann CS, Loeffler HH, *et al*, 2003. Influence of backbone conformations of human carbonic anhydrase Ⅱ on carbon dioxide hydration: Hydration pathways and binding of bicarbonate [J]. *J Am Chem Soc*, **125** (29): 8921—8927

McCall KA, Huang CC, Fierke CA, 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes [J]. *J Nutr*, **130**: 1437S—1446S

Nagai R, Kooh SW, Balfe JW, *et al*, 1997. Renal tubular acidosis and osteopetrosis with carbonic anhydrase Ⅱ deficiency: Pathogenesis of impaired acidification [J]. *Pediatr Nephrol*, **11**: 633—636

Nakata K, Shimomura N, Shiina N, *et al*, 2002. Kinetic study of catalytic CO_2 hydration by water-soluble model compound of carbonic anhydrase and anion inhibition effect on CO_2 hydration [J]. *J Inorg Biochem*, **89**: 255—266

Pastorekova S, Casini A, Scozzafava A, *et al*, 2004. Carbonic anhydrase inhibitors: The first selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the tumor-associated isozyme Ⅸ [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, **14**: 869—873

Roth DE, Venta PJ, Tashian RE, *et al*, 1992. Molecular basis of human carbonic anhydrase Ⅱ deficiency [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, **89**: 1804—1808

Rousselle AV, Heymann D, 2002. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption [J]. *Bone*, **30** (4): 533—540

Scolnick LR, Clements AM, Liao J, *et al*, 1997. Novel binding mode of hydroxamate inhibitors to human carbonic anhydrase Ⅱ [J]. *J Am Chem Soc*, **119** (4): 850—851

Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, *et al*, 1999. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96** (26): 15184—15189

Sterling D, Reithmeier RAF, Casey JR, 2001. A transport metabolon [J]. *J Biol Chem*, **276** (51): 47886—47894

Sun MK, Alkon DL, 2002. Carbonic anhydrase gating of attention: Memory therapy and enhancement [J]. *Trends Pharmacol Sci*, **23** (2): 83—89

Supuran CT, Scozzafava A, Casini A, 2003. Carbonic anhydrase inhibitors [J]. *Med Res Rev*, **23** (2): 146—189

Thoms S, 2002. Hydrogen bonds and the catalytic mechanism of human carbonic anhydrase Ⅱ [J]. *J Theor Biol*, **215**: 399—404

Tripp BC, Bell CB, Cruz F, *et al*, 2004. A role for iron in an ancient carbonic anhydrase [J]. *J Biol Chem*, **279** (8): 6683—6687

Tripp BC, Smith K, Ferry JG, 2001. Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme [J]. *J Biol Chem*, **276** (52): 48615—48616

Vicker N, Ho Y, Robinson J, *et al*, 2003. Docking studies of sulphamate inhibitors of estrone sulphatase in human carbonic anhydrase Ⅱ [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, **13**: 863—865

Vince JW, Carlsson U, Reithmeier RAF, 2000. Localization of the Cl^-/HCO_3^- anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase Ⅱ [J]. *Biochemistry*, **39** (44): 13344—13349

Wingo T, Tu C, Laipis PJ, *et al*, 2001. The catalytic properties of human carbonic anhydrase Ⅸ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **288** (3): 666—669

Winum JY, Pastorekova S, Jakubickova L, *et al*, 2005. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic tumor-associated carbonic anhydrase isozymes Ⅰ, Ⅱ, and Ⅸ with bis-sulfamates [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, **15**: 579—584